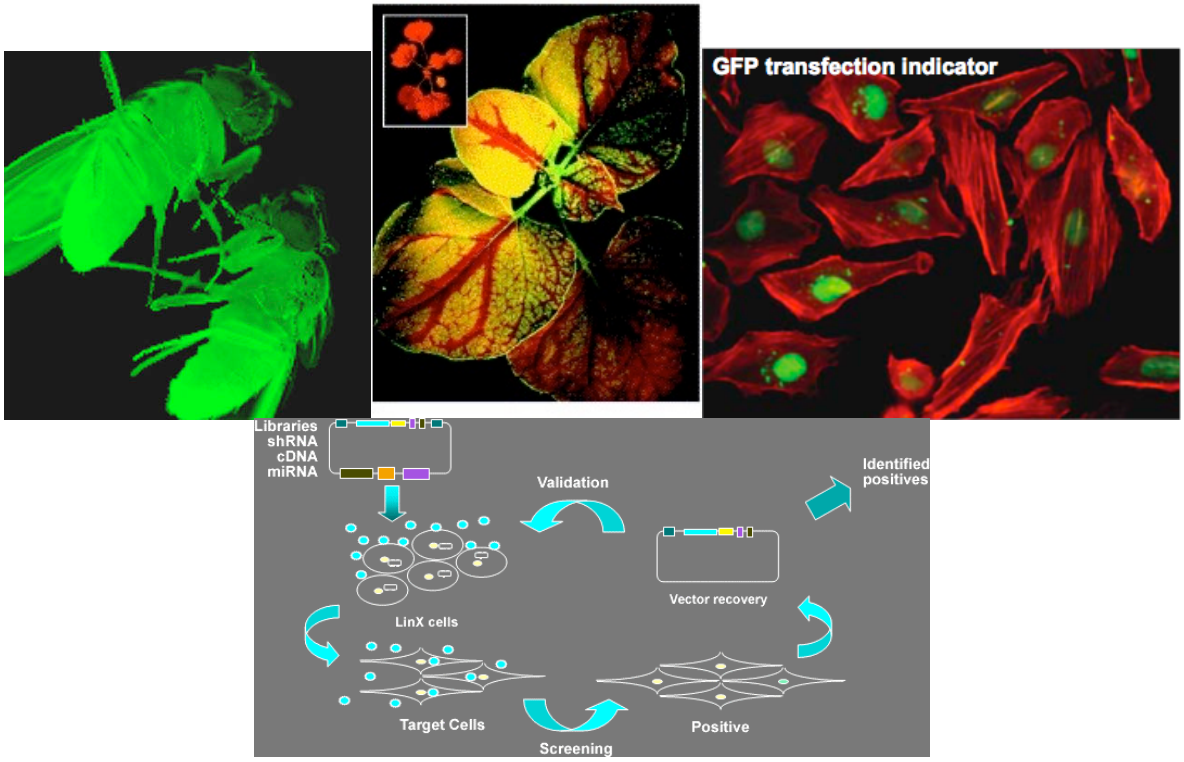
Master BMC UE MV442 2009-2010



Présentation pédagogique de l'UE MV442
Introduction théorique et expérimentale à l'épigénétique

a) Objectifs de la partie Travaux Pratiques

L'extinction de gène est un mécanisme de régulation de l'expression génique dont le rôle anti-viral a été découvert chez les plantes il y a environ une dizaine d'années. Cette unité d'enseignement expérimentale porte sur l'étude du mécanisme de l'extinction de gènes chez les plantes, les invertébrés et les mammifères. La pédagogie utilisée lors de cet UE repose en grande partie sur la réalisation et l'analyse d'expérimentations simples mais très spectaculaires et informatives sur le phénomène d'extinction de gènes.

_b) Thèmes abordés

- Expériences historiques qui ont conduit à la découverte du mécanisme de l'extinction de gènes (immunité anti-virale).
- Stratégies d'extinction des gènes (ARNi et siRNA sur cellules ou organisme entier).
- Applications de l'extinction de gènes à différents modèles (animal, végétal) pour étudier la fonction des gènes en système homologue ou hétérologue.

Co-responsables de l'UE
Evelyne Téoulé Evelyne.Teoule@versailles.inra.fr (01 30 83 33 06)
Sévérine Planchais severine.planchais@upmc.fr (01 44 27 62 32)

Equipe pédagogique Partie Travaux Pratiques
Séverine Planchais. severine.planchais@upmc.fr (01 44 27 62 32)
Sylvie Collin sylvie.collin@upmc.fr (01 44 27 59 13)
Marco Da Costa mdacosta@snv.jussieu.fr (01 44 27 37 35)
Frédérique Péronnet frederique.peronnet@upmc.fr (01 44 27 27 39)
Raphaëlle Grifone raphaelle.grifone@snv.jussieu.fr (01 44 27 28 04)

Secrétariat

Carine Joseph carine.joseph@snv.jussieu.fr 01 44 27 35 35

Déroulement de l'UE

Cours Bâtiment K. 1er étage salle 120

Partie Pratique Ateliers de biotechnologie, Atrium, 3ème étage

SEMAINE 1

	LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
8h					
8h 30	Introduction : SB Cours ARN 1 : LT	Cours : Méthylation ex plantes ET			
9h					
9h 30			TD Bioinformatique à l'UTES : MdC et RG Outils ARNi 2h	Infection des cellules MDC (30 min)	Milieu neuf
10h				Observation plantes SC / SP	Observation plantes SC / SP
10h30		Lavage agrobactéries SC / SP (1h)		Cours : prions CF (2h)	Cours (3h) : histones/ chromatine Trithorax PcG FP SB
11h	Cellules Digestion ADN FP (1h)	Transcription *in vitro* FP (1h)	Vérification des ARNs sur gel FP (1h)		
11h 30					
12h					
12h 30				Infection des cellules MDC (30 min)	
13h					
13h 30	Cellules Ensemencement MDC RG (2h)	Transfection de cellules MDC (2 h)	Microscopie Efficacité Transfection Ensemencement MDC (1h + 2h)	TD1 prions : CF (2h) TD2 la reine des abeilles : SB (1h)	
14h					
14h 30					
15h					
15h 30	Gel d'agarose Vérification FP (1h)	Infiltration des plantes SC / SP (1h)			
16h					
16h 30		DNAse Précipitation FP (1h)	Observation des plantes		
17h	Agrobactéries SC ou SP ? (30 min)				
17h 30					
18h					

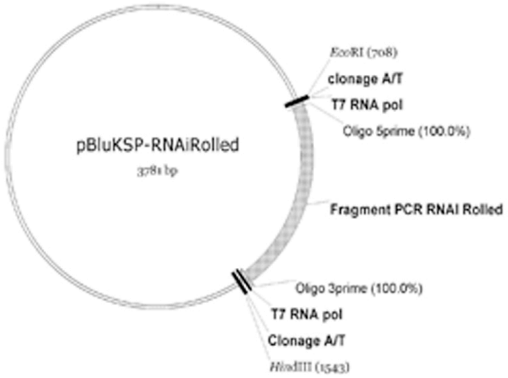
SEMAINE 2

	LUNDI	MARDI	MERCREDI	JEUDI	VENDREDI
8h30					
9h	Cours : ARNs fin (1h) : LT Hétérochromatine (2h) : ET	TD empreinte parentale (3h) EMV	Dissection larves Observations drosophiles FP 3h	Extraction de protéines	
9h30					Lavages Anticorps secondaires Révélation FP MdC RG
10h30				Dosage de protéines	
11h30					Observation plantes 15min Mouvement SC / SP
12h			Observation plantes SC / SP	Dépôt Migration des gels	
13h					Analyse des résultats
13h30	Ensemencement MDC 2h	Conférence sur l'inactivation de l'X Edith Heard			
15h			Conférence : Louisa Dandolo empreinte mammifères		
15h15	Cellules + ARNds FP 1h30			Transfert sur membrane	
16h			Cours : vernalisation (2h) ET	Blocage	
16h30	Observation plantes SC / SP				
18h					

Inactivation par ARN interférence du gène codant la MAP kinase ERK dans les cellules S2 de drosophile [d'après "RNAi in cultured Drosophila cells." Kao and Megraw (2004) Methods Mol Biol 247, 443-457 et "Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways." Clemens *et al.* (2000) PNAS 97, 6499-6503].

1. Préparation de l'ARN double brin

↳ Lundi 1: Préparation de l'ADN pour la transcription: digérer 10µg du plasmide pBluKSP-RNAiRolled par EcoRI et HindIII. Après migration sur gel d'agarose, purifier le fragment de 780 pb avec le kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Mesure de la concentration de l'ADN (nanodrop)



↳ Mardi 1: Production de l'ARN double brin à partir de ce fragment d'ADN en utilisant le kit Promega Ribomax large-scale RNA Production System-T7:

A partir de ce moment, pour préserver les ARN, manipuler exclusivement avec des gants et des cônes à filtre

- mélanger 1µg d'ADN, 15µL de nucleotide triphosphate 25mM, 10µL de tampon de réaction 5X, 1µL de Riboblock™ (Fermentas), 5µL d'enzyme, H2O qsp 40µL
- incuber à 37°C 5h
- ajouter 1µL de Dnase RNase-free, incuber à 37°C 15 minutes
- précipiter l'ARN double-brin : ajouter 50µL d'eau RNase-free, 10µL d'acétate de sodium 3M pH 5.2, 250µL d'éthanol absolu et placer à -20°C une nuit

↳ Mercredi 1:

- centrifuger à 13000g 4°C 20 minutes, jeter le surnageant
- rincer le culot avec 500µL d'éthanol 70, centrifuger à 13000g 4°C 5 minutes
- sécher le culot puis le reprendre dans 100µL d'eau RNase-free, resuspendre en vortexant
- prélever 1µL
- chauffer l'ARN restant à 60°C pendant 30 minutes puis laisser revenir doucement à température ambiante
- faire migrer 1µL sur gel d'agarose pour tester la qualité de la préparation
- mesurer la concentration des ARN au Nanodrop; ajuster à 30µg/10µL avec de l'eau RNase-free

- Conserver les ARN à -20°C

De la même façon, des ARN double-brin contrôles dirigés contre la GFP ont déjà été préparés.

2. Préparation des cellules

↳ Jeudi 1: Ensemencer les cellules : 2.10^6 cellules pour 2mL de milieu Schneider avec des antibiotiques sans serum dans des plaques à 6 puits, faire 2 puits.

3. Traitement des cellules avec les ARN double-brin (J0)

↳ Vendredi 1: Déposer les ARN double-brin à la concentration finale de 40nM (pour un fragment de 700pb, 40nM correspond à 15µg d'ARN double brin dans 1mL de milieu) : puit 1, ARN contrôle GFP 30ng; puit 2, ARN ERK 30ng. Bien mélanger en balançant doucement la plaque. Remettre les cellules à 25°C.

4. Préparation des extraits protéiques et électrophorèse

- Jeudi2 :
  - Prélever les cellules (en partie en suspension, en partie accrochées au plastique) en pipettant "up and down" plusieurs fois et en rinçant bien le fond de chaque puit
  - Transférer dans un tube Eppendorf de 2,2mL.
  - Centrifuger à 2500g 20°C 8 minutes, éliminer le surnageant, resuspendre le culot dans 500µL de PBS 1X
  - Répéter le point précédent
  - Resuspendre chaque culot dans 50µL de tampon RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NP-40 0,1%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, 1 tablette d'inhibiteurs de protéases Roche pour 10mL) en pipettant "up and down" plusieurs fois; laisser 15 minutes sur la glace (lyse).
  - Centrifuger à 13000g 4°C 15 minutes
  - Reprendre le surnageant
  - Doser les protéines par Bradford (sur 5µL)
  - Ajouter 15µL de tampon de Laemmli 4X
  - Déposer l'équivalent de 25µg de protéines par puit sur gel d'acrylamide-SDS; déposer également un marqueur de poids moléculaire
  - Plan du gel: puit 1: Laemmli 1X; Puit 2: MWM 10µL; Puit 3: control; Puit 4: RNAi ERK; Puit 5: Laemmli 1X

5. Analyse des protéines par Western blot

- Jeudi2 :
  - Après la migration, transférer les protéines sur un filtre de nitrocellulose (membrane ECL, GE Healthcare).
  - Incuber pendant 45 minutes dans du Blotto (TBS 1X, Tween 20 0.1%, Lait écrémé 5%)
  - Rincer 3 fois 5 minutes avec du TBS 1X, Tween 20 0.1%.
  - Couper le filtre en 2 au niveau du marqueur 55kDa.
  - Préparer 5mL de TBS 1X, BSA 3% pour chaque filtre.

- Ajouter sur le filtre correspondant au haut du gel l'anti-β tubuline (souris) (témoin de charge) au 1/1000 (0,5µL) et sur le filtre correspondant au bas du gel l'anti-ERK (C16, lapin) au 1/1000 (0,5µL).
- Laisser sur la balancelle à 4°C pendant la nuit.

6. Révélation

- même procédure que pour les autres filtres : pour l'anti-β tubuline, utiliser le secondaire anti-IgG de souris marqué à la phosphatase alcaline et pour C16, utiliser le secondaire anti-IgG de lapin marqué à la phosphatase alcaline.

Inactivation par ARN interférence d'un transgène exprimant la GFP chez *Drosophila melanogaster* [d'après Roignant *et al.* (2003) Absence of transitive and systemic pathways allow cell-specific and isoform-specific RNAi in *Drosophila*. RNA 9, 299-308].

Cycle de vie de *Drosophila melanogaster* :

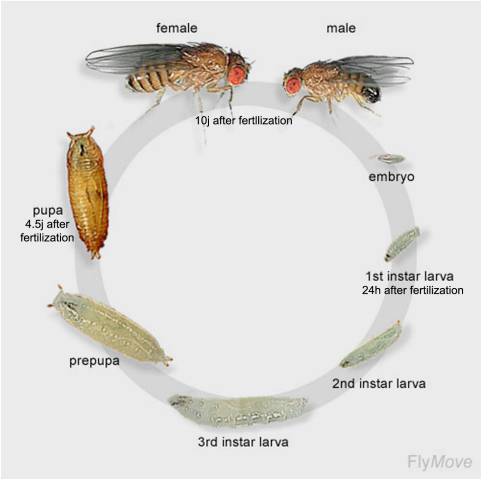
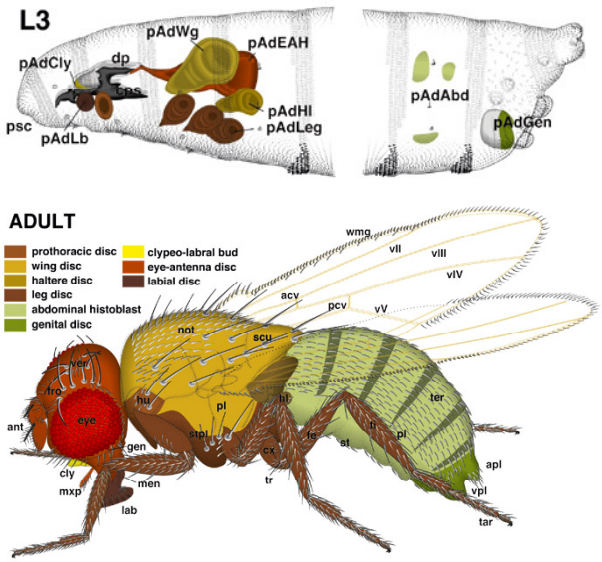
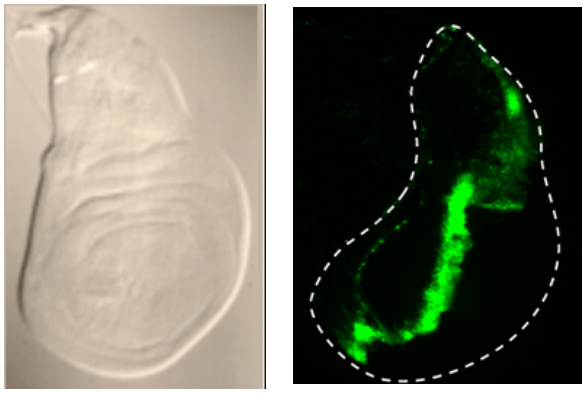


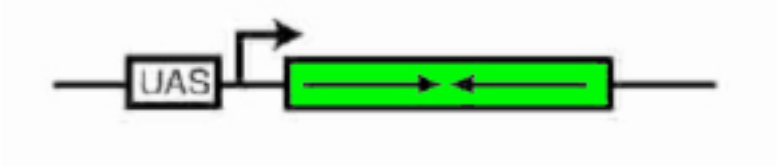
Schéma d'une larve de 3ème stade (L3) et d'un adulte de *Drosophila melanogaster* d'après V.Hartenstein, Atlas of Drosophila development, les disques imaginaux des larves de 3ème stade préfigurent les appendices de l'adulte :



Expression de la GFP dans un disque imaginal d'aile de larve L3 sous le contrôle d'un pilote *patched* (*ptc*) (expression à la frontière des compartiments antérieur et postérieur) (à gauche contraste de phase ; à droite : fluorescence ; génotype *ptc::Gal4; UAS::GFP/+*) :



Transgène permettant de produire un ARN double brin GFP (*UAS::RNAiGFP*) sous le contrôle d'un pilote Gal4 et qui induira l'inactivation de la GFP par ARN interférence :



Nous dissèquerons des disques imaginaux d'aile de larves L3 et comparerons le profil d'expression de la GFP.

Expérience d'extinction de l'expression de gènes sur des cellules de mammifères

Les techniques d'extinction de l'expression de gènes ou *silencing* sont couramment utilisées pour étudier les fonctions de ces derniers. Plusieurs approches sont disponibles pour effectuer un *silencing* de gène dans les cellules de mammifères. Les deux approches principales consistent : i) d'une part en une approche basée sur l'ARN interférent (RNAi) et ii) d'autre part en une approche basée sur l'ADN (shRNA).

Le RNAi consiste à transfecter transitoirement la lignée cellulaire d'intérêt par un duplex d'ARN reconnaissant spécifiquement le transcrit du gène cible. Cette méthode simple et efficace permet de diminuer significativement l'expression du gène ciblé.

Le shRNA consiste à transfecter transitoirement ou de façon stable la lignée cellulaire d'intérêt par un vecteur contenant une séquence d'ADN qui produira les petits ARN qui reconnaîtront le transcrit du gène cible.

Au cours de cet atelier, nous utiliserons la technique de silencing par shRNA à l'aide de vecteurs rétroviraux désarmés. Nous inactiverons le gène Trp53 dans la lignée cellulaire murine NIH3T3.

1) Préparation des vecteurs rétroviraux utilisés au cours de l'atelier (disponibles avant l'atelier)

1-1) Caractéristiques principales des vecteurs rétroviraux

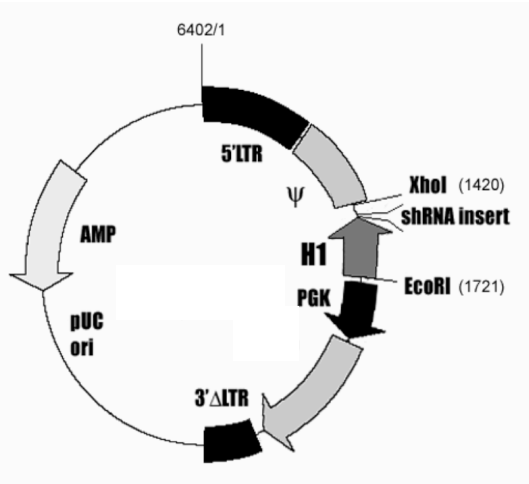
Les vecteurs rétroviraux sont actuellement les seuls à permettre une expression stable puisqu'ils s'intègrent dans le génome de la cellule infectée. L'expression des gènes transférés est relativement longue, les gènes transférés étant ainsi transmis aux cellules filles au cours des divisions. Cependant, leur emploi reste limité au transfert de gènes dans des cellules en division car ils nécessitent une rupture de la membrane nucléaire pour que le transgène ait accès à l'ADN nucléaire.

C'est grâce à l'utilisation de ce type de vecteur que des enfants atteints de syndrome immunitaire combiné sévère lié à l'X (« enfants bulles ») ont pu être traités par l'équipe d'Alain Fischer et Marina Cavazzana-Calvo à l'hôpital Necker.

L'emploi de ces vecteurs rétroviraux est également limité à des cellules facilement prélevables pour une modification *ex vivo.* En effet, ils sont très rapidement inactivés par le système du complément lorsqu'ils sont injectés par voix systémique. Des études sont actuellement en cours afin de permettre cette utilisation systémique et d'élargir ainsi leurs indications thérapeutiques. D'autres vecteurs rétroviraux pourraient être utilisés de façon plus large car ils permettent une infection des cellules au repos. Il s'agit des vecteurs issus de la famille des lentivirus. Ces vecteurs sont encore à l'étude car il faut

notamment s'assurer de leur innocuité.

Les vecteurs utilisés au cours de cet atelier sont dérivés du MSCV (Murine Embryonic Stem Cell Virus).



H1 et PGK :

séquences promotrices

SM : selection marker

Ces vecteurs contiennent les séquences suivantes :

LTR : Long Terminal Repeat

Ψ : séquence d'encapsidation du vecteur recombinant

Séquences promotrices : promoteurs adaptés en amont du shRNA et du (des) gène(s) de sélection SM (antibiotiques ou/et gènes rapporteurs type GFP).

AMP : gène de résistance à l'ampicilline (sélection des bactéries lors de l'étape de clonage/amplification du plasmide)

Au cours de cet atelier, nous utiliserons les **vecteurs suivants** :

pMLS : vecteur ayant un gène rapporteur GFP

pMLP : vecteur ayant un gène rapporteur GFP et une sélection à la puromycine

pMLS shmTrp53 : vecteur ayant un gène rapporteur GFP et un shRNA dirigé contre Trp53

pMLP shmTrp53 : vecteur ayant un gène rapporteur GFP, une sélection à la puromycine et un shRNA dirigé contre Trp53

Ecotropic helper (vecteur non rétroviral) : packaging genes, gag-pol-env

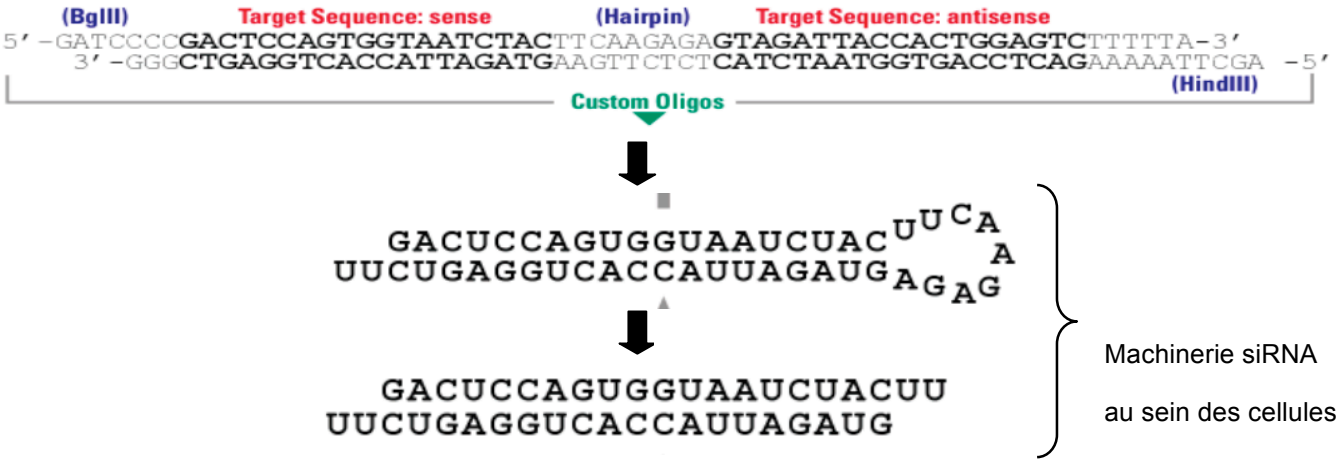
Ces vecteurs ont été transformés dans des bactéries *E. coli* XL1. Ces bactéries transformées ont ensemencées 500 ml de milieu de culture de type LB supplémenté avec de l'ampicilline, puis mises en culture à 37°C pendant une nuit. Le lendemain, les cultures sont centrifugées à 6000 g pendant 10 minutes puis les ADN plasmidiques ont été purifiés en utilisant le kit Midi Prep Qiafilter selon les recommandations du fournisseur Qiagen.

1-2) Obtention des vecteurs shRNA (cette partie sera complétée lors de la demi journée de bioinformatique)

Design des inserts

Pour induire spécifiquement le silencing du gène désiré, ces vecteurs sont optimisés pour intégrer une paire d'oligonucléotides qui contiennent une séquence de 19 à 22 nucléotides dérivée du transcrit ARNm du gène cible. Ces séquences sont générées à l'aide de logiciels spécifiques. Après avoir générés les couples d'oligonucléotides spécifiques du gène cible, ces amorces sont commandées. A la réception de vos amorces, celles ci seront hybridées selon un protocole standard.

Exemple de la transcription d'un oligonucléotide de 60 pb en shRNA



En parallèle, votre/vos vecteur(s) rétroviraux auront été linéarisés par les enzymes de restriction appropriées (pour cet exemple par BglII et HindIII).

Une étape de clonage (ligation de vos amorces dans le vecteur de destination linéarisé) sera ensuite effectuée et les bactéries transformées seront analysées pour la présence du plasmide. Après extraction du plasmide, celui-ci sera séquencé afin de vérifier l'intégrité de l'insert. Les clones sélectionnés seront ensuite amplifiés comme décrit précédemment et un stock d'ADN plasmidique de concentration connue sera conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

La plupart des vecteurs rétroviraux peuvent être utilisés

i) directement pour transfecter des cellules de mammifères désirées (transfection transitoire)

ii) ou pour transfecter des « packaging cells » qui vont produire les rétrovirus dans le milieu de culture, rétrovirus utilisés pour infecter les cellules de mammifères de manière stable.

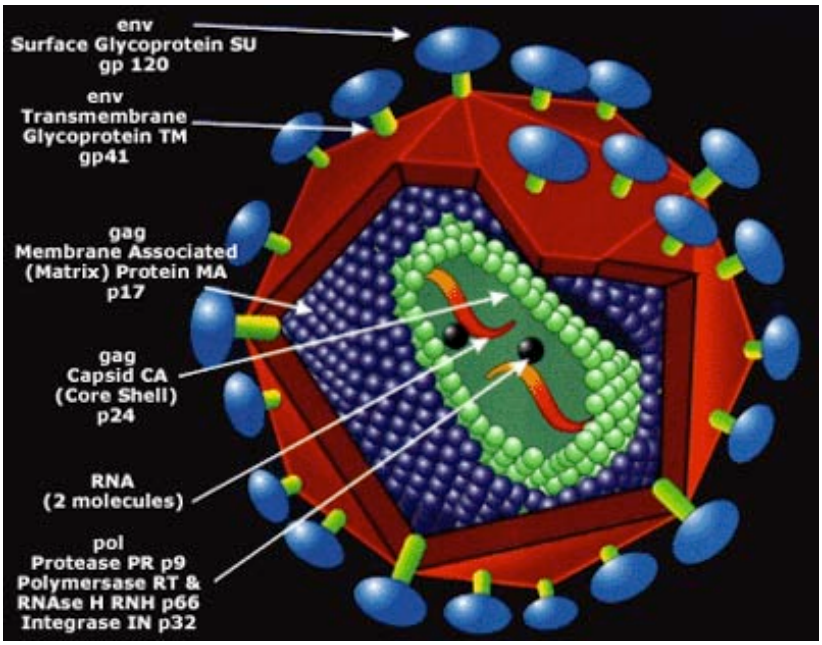
Nous utiliserons cette seconde approche au cours de l'atelier.

2) Transfection et infection

Il existe un grand nombre de lignées « packaging cells ». Ces cellules sont optimisées pour produire de façon rapide des virus infectieux dans le milieu de culture. L'absence de particules rétrovirales compétentes pour la réplication est testée dans ces lignées cellulaires. Nous utiliserons des « packaging cells » capables de produire des virus infectant les lignées cellulaires murines.

Ces cellules expriment les protéines GAG (group specific antigen), POL (polymerase) et ENV (envelop protein). GAG est une polyprotéine impliquée dans la formation de la matrice et de la capside, ENV code pour des protéines de la surface membranaire qui sont responsables de l'attachement du virion à la membrane des cellules « hôtes », POL code pour la reverse transcriptase qui possède des fonctions d'intégrase et de RNase H.

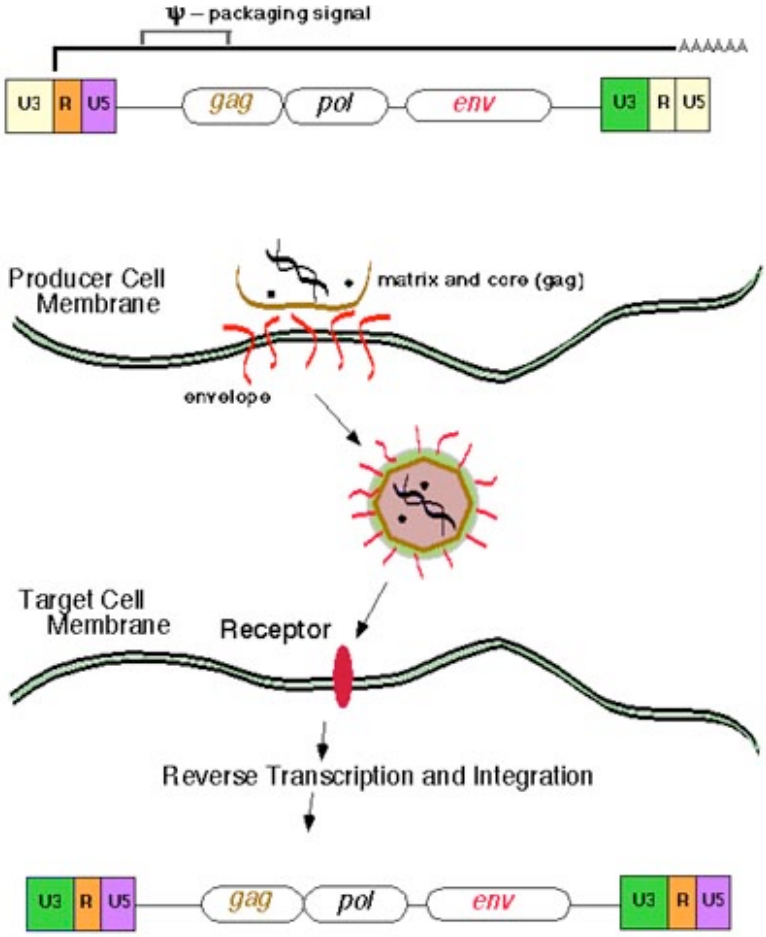
Visualisation 3D de la structure d'un rétrovirus



tiré du laboratoire de Nolan, Stanford

Les gènes *gag, pol* et *env* sont clonés dans des plasmides permettant une sélection spécifique et sont transfectés dans des cellules hôtes qui après sélection pour l'intégration du/des insert(s) exprimant ces gènes et les gènes de sélection seront testées pour leur capacité de production de particules rétrovirales désarmées.

Obtention de packaging cells



Les packaging cells (et les cellules à infecter) utilisées sont mises en culture en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplémenté avec 10% de Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma) et 1% d'antiobiotique-antimycotique (Gibco), ce milieu sera nommé milieu complet, en boites de 10 cm (Falcon) et incubées dans un incubateur à 37°C, 5% de CO_2.

Attention : la majorité des manipulations doit être réalisée en conditions stériles sous hotte à flux laminaire avec une blouse et des gants.

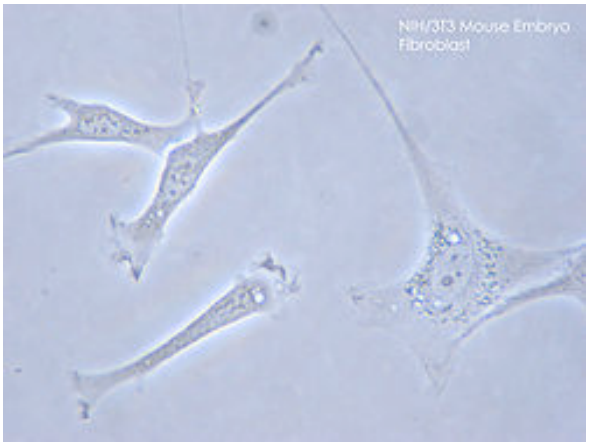
2-1) Protocole de transfection des packaging cells et d'infection des cellules hôtes NIH3T3

Jour 1 : ensemencement des packaging cells

Les packaging cells mises en culture préalablement seront ensemencées en vue des transfections. Pour ce faire, les milieux de culture seront aspirés, les cellules seront rincées **délicatement** (ces cellules sont faiblement adhérentes) avec du PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM sodium phosphate dibasic, 2 mM potassium phosphate monobasic, pH of 7.4). Après aspiration du PBS, les cellules sont décollées par ajout de 5 ml de milieu complet et par flux-reflux à la pipette. Les 5 ml sont récupérés dans un tube adapté puis un aliquot est prélevé pour comptage du nombre de cellules par ml à l'aide d'une cellule de Malassez (voir annexe).

0.5 à 1 × 10^7 de packaging cells par boite de 10 cm sont mises en culture dans 8 ml de milieu complet puis placées dans l'incubateur.

Les cellules à infecter sont des cellules murines NIH3T3. Ce sont des cultures de fibroblastes couramment utilisés en laboratoire :



Nous passerons les NIH3T3 au cours du premier jour. Pour cela, les milieux de culture seront aspirés, les cellules seront rincées avec du PBS 1X , le PBS est aspiré et 1 ml de Trypsine EDTA est ajouté par boite de 10 cm, les boites sont placées 5 minutes dans l'incubateur. Au bout de 5 minutes, 8 ml de milieu complet est ajouté par boite et l'ensemble du liquide contenant les cellules en suspension est placé dans un tube adapté qui va être centrifugé à 1300 RPM pendant 5 minutes. Le surnageant sera aspiré, les cellules seront re-suspendues dans 2 ml de milieu complet et vous ensemencerez 4 boites contenant 8 ml de milieu complet avec 500 µl de la suspension cellulaire.

Jour 2 : transfection des packaging cells

Plusieurs méthodes de transfection sont couramment utilisées dans les laboratoires de recherche : i) par le phosphate de calcium, ii) par des surfactants lipidiques, iii) par électroporation, iv) par des polymères.

Nous utiliserons un polymère, le polyethyleimine PEI (Polysciences) qui aura été préparé préalablement à 1 mg/ml, aliquoté et stocké à -20°C.

Nous préparerons l'ADN à transfecter de la façon suivante :

- 10 à 20 μg du vecteur rétroviral

- 5 à 10 μg d'ecotropic helper (augmente la production de virions)

- ajouter 1 ml de DMEM sans FBS ni antibiotique

- ajouter 75 μl de PEI à 1 mg/ml

- vortexer

- laisser reposer 10 à 30 minutes à température ambiante

- ajouter la solution préparée aux packaging cells par goutte à goutte

- « homogénéiser » le milieu de culture, placer les boites de culture dans l'incubateur

La moitié des binômes transfectera : pMLS, pMLS shmTrp53 et l'autre moitié pMLP, pMLPshmTrp53. Deux boites de packaging seront donc transfectées pour chaque binôme.

Jour 3 : vérification de la transfection, ensemencer les NIH3T3

L'efficacité de transfection des packaging cells sera estimée par visualisation au microscope à épifluorescence du nombre de cellules présentant une fluorescence GFP. Le milieu de culture sera remplacé par 6 ml de milieu complet neuf.

Les NIH3T3 seront mises en suspension (comme décrit précédemment) et un comptage sera effectué. Un million de NIH3T3 seront mises en culture par boîte dans 8 ml de milieu complet.

Jour 4 : infection des NIH3T3 par les rétrovirus

Le surnageant (6 ml) des packaging cells sera prélevé à l'aide de seringues. Le milieu contenant les virions sera filtré *via* un filtre de 0,45 μm. 4 μg/ml de polybrène (Sigma) seront ajoutés à ces 6 ml filtrés. Enfin, après avoir ôté le milieu de culture des NIH3T3, les 6 ml seront ajoutés aux cellules.

Les packaging cells seront remises en culture avec 6 ml de milieu complet pendant 3-4 heures puis comme précédemment le milieu sera utilisé pour faire une seconde infection des NIH3T3.

Les packaging cells transfectées seront ensuite jetées dans les poubelles à autoclaver après avoir laissé agir de la javel pendant une dizaine de minutes.

Jour 5 : traitement des cellules infectées

Le milieu d'infection (12 ml) sera ôté et décontaminé par un traitement à l'eau de javel et les cellules seront mises en culture dans du milieu complet neuf.

Jour 6 : le milieu contenant les virus est éliminé et les NIH3T3 sont mises en présence de milieu complet neuf.

Jour 8 : afin de connaître le pourcentage de cellules infectées, les cellules sont mises en suspension et un aliquote est analysé par cytométrie de flux pour détecter la présence de GFP. Si les vecteurs utilisés portent tous une sélection GFP, vous pouvez estimer votre pourcentage d'infection pour chacune de vos constructions, si non en utilisant le contrôle positif GFP (vecteur vide) vous pourrez faire une approximation du pourcentage d'infection pour les vecteurs dépourvus de GFP et ayant été utilisés en parallèle de ce contrôle.

Le pourcentage d'infection dépend de plusieurs paramètres dont nous discuterons au cours de l'atelier (cellules, vecteurs, états des cellules, milieux, les gènes à infecter…). Pour les cellules NIH3T3, une infection de 60-70% est un minimum. La plupart des vecteurs rétroviraux ayant un gène de sélection à un antibiotique, les cellules infectées peuvent être mises en culture dans un milieu de sélection jusqu'à l'apparition d'une population stable (en parallèle vous avez une culture NIH3T3 non résistante à votre antibiotique).

Selon le pourcentage d'infection, nous ensemencerons les cellules en milieu sélectif ou non.

2-2) Analyse de l'extinction de l'expression du/des gènes

Vous pouvez ensuite procéder à l'analyse de l'extinction de l'expression du gène.

Les méthodes (complémentaires) sont généralement une analyse par PCR en temps réel, des western blots, analyses de phénotype…

Analyse des protéines par western blot

Cette partie sera effectuée en même temps que pour la partie « drosophile ».

Les cellules infectées par les différents rétrovirus seront aliquotées. Chaque binôme fera une extraction de protéines.

- lyse des cellules dans 50 ul de tampon RIPA (recette partie drosophile)

- centrifugation à 13000g pendant 15 minutes à 4°C

- prélever le surnageant dans un tube neuf

- dosage des protéines par Bradford

- préléver 30-50 ug de protéines

- ajouter x ul du tampon Laemmli 4X pour obtenir 1X

- placer à 100°C 5 minutes

- déposer sur gel SDS PAGE

Après migration et transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (coloration au rouge ponceau), couper la membrane en deux au niveau de la bande 70 kDa (annoter les membranes)

incuber les membranes environ 30 minutes dans du TBS 1X-Lait 5%-tween20 0,1% puis rincer 3 fois avec TBS 1X –tween20 0,1% pendant 5 minutes

ajouter les anticorps anti-Trp53 et anti actinin (témoin de charge) dilués au 1/1000 dans du TBS1X –BSA 3% sur les membranes correspondantes

incuber une nuit sous « agitation » à 4°C

Révélation

incuber avec les anticorps secondaires appropriés (dilués au 1/1000 dans du TBS1X –BSA 3%) puis rincer 3 fois avec TBS 1X -tween 0,1% pendant 5 minutes et poursuivre avec la révélation à l'ECL et exposition du film autoradiographique.

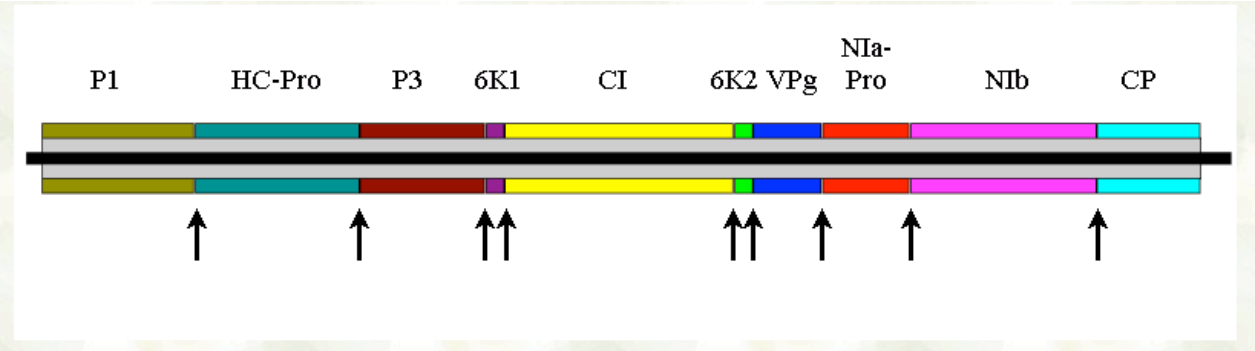
Inactivation d'un transgène dans des plantes de tabac et effet d'une protéine virale (PRO) sur l'extinction de gènes .

Carte d'identité des Potyvirus

Le genre potyvirus est le genre le plus étudié dans la famille des Potyviridae. Le nom de ce genre vient du plus connu de ses membres le virus Y de la pomme de terre (Potato virus Y PVY). Les particules sont en filaments flexueux, non enveloppées, de 720-850 nm de long et de 12-15 nm de diamètre. Ils forment des corps d'inclusion dans les cellules végétales et leur génome monopartite code une polyprotéine. Ils sont transmis par les insectes.

Génome

Monopartite, linéaire, ARN simple brin de polarité positive d'environ 10 000 nucléotides de long. L'extrémité 3' terminale a une queue poly-A et l'extrémité 5' terminale a une protéine VPg (codée par le génome viral, Viral Protein g).



Carte du génome de Potyvirus

Le génome du Potyvirus est traduit en une seule polyprotéine puis la polyprotéine est clivée en 10 protéines, la protéine de capside (CP) étant située en N-terminal.

P1 protein	32.4 kDa	unknown function
HC-Pro	51.9 kDa	Helper Component (insect transmission)
P3 protein	41.5 kDa	unknown function
6K1	6.0 kDa	unknown function
CI	71.4 kDa	Cylindrical inclusion protein possibly involved in cell to cell movement
6K2	5.5 kDa	unknown function
VPg	21.7 kDa	Genome-linked protein
NIa-pro	27.7 kDa	Nuclear Inclusion proteinase
NIb	59.8 kDa	Nuclear Inclusion polymerase
CP	29.8 kDa	coat protein

Inactivation de l'expression d'un transgène dans des plantes de tabac et effet d'une protéine virale (PRO) sur l'extinction de gènes (d'après Ruiz et al. 1998, Plant Cell, 10 (6) 937-946).

Il est possible d'induire dans une plante l'inactivation de l'expression d'un transgène par l'expression transitoire de séquences homologues. Nous allons utiliser une lignée transgénique de *Nicotiana benthamiana* exprimant la GFP de manière constitutive (lignée 16C). Cette lignée a été créée dans le laboratoire de David Baulcombe (John Innes Centre, Royaume-Uni). Sous les UV, la plante est verte. Quand on infiltre les feuilles avec une souche d'agrobactérie portant une construction permettant de surexprimer le gène *GFP*, la zone de la feuille infiltrée devient rouge sous les UV : on visualise alors seulement la fluorescence de la chlorophylle. On peut donc induire l'inactivation de l'expression du transgène *GFP* et suivre le mouvement de cette inactivation dans la plante entière à partir de la zone infiltrée (mouvement systémique).

Protocole d'infiltration sur tabac

1. Préculture d'agrobactéries (2mL de milieu LB+antibios, 28°C, une nuit ou deux jours)

2. Ensemencer dans un erlen 40mL de milieu LB+antibios avec 50µl de la culture de la veille (ou de deux jours)

- 35S-GFP : kanamycine 50µg/ml rifampicine 50µg/ml
- pBIN19 : kanamycine 50µg/ml rifampicine 50µg/ml
- pBIN19-35S-Pro : kanamycine 50µg/ml tétracycline 5µg/ml

Culture une nuit à 28°C avec agitation

3. Récolte des agrobactéries:

Lecture de la DO à 600nm sur 1mL de la culture de nuit : il faut que la DO soit supérieure ou égale à 1. Blanc=milieuLB+antibios.

Prélever 20mL sur les 40mL. Réserver le reste à 4°C

Centrifuger les 20mL d'agrobactéries dans un falcon de 50ml à 5000g 20 min à température ambiante.

Enlever le surnageant et reprendre le culot dans 10mL de mileu MMA.

Ajuster la DO à 1 en diluant avec du tampon MMA. Blanc=tampon MMA.

4. Si on veut agro-infiltrer avec un mélange de 2 agrobactéries, il faut faire un mélange équi-volume des 2 souches d'agrobactéries

5. Laisser au repos au moins 2h sur la paillasse

Planning des agroinfiltrations

35S-GFP

pBIN19

pBIN 19-35S-Pro

pBIN19-35S-Pro **ET** 35S GFP (A mélanger au moment du point 4.)

tampon MMA seul

Infiltrer directement avec une seringue en plastique de 2mL (sans l'aiguille) sur la face inférieure de la feuille (2 feuilles par plante, 2 infiltrations par feuilles de part et d'autre de la nervure principale). Mettre des gants pour l'infiltration et changer à chaque fois qu'on change de souche d'agrobactéries.

Mettre des étiquettes sur le pétiole de chaque feuille pour repérer quelles constructions sont utilisées.

Observer à l'obscurité avec une lampe UV (J3 et J4). Mettre des masques pour se protéger des UV.

SOLUTIONS MÈRES

Tampon MES 100mM: peser 1,95g de MES (195,2g/mol) pour faire 100mL de tampon à 100mM. Diluer dans H2O. Pas besoin de prendre le pH. Filtrer sur 0,45µm. Aliquoter par 20mL dans des falcons et congeler des aliquots à -20°C

MgCl2 0,2M

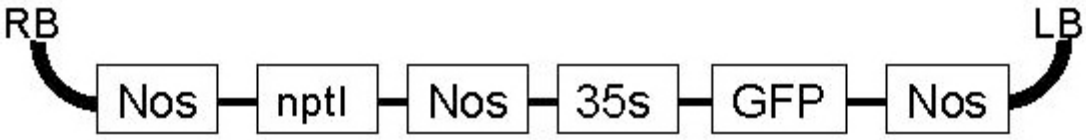
Acetosyringone 100mM (dans DMSO) stocker à -20°C en aliquots de 500µl

Lors de la manip ou le jour précédent : préparation du tampon MMA (ne sera pas autoclavé)

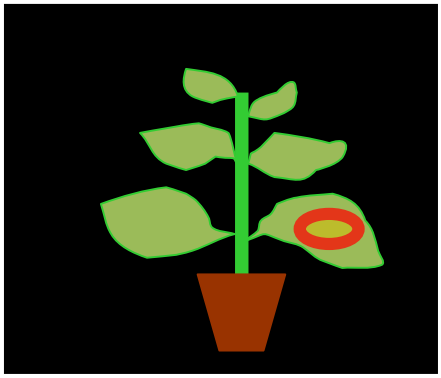
Pour 200mL de tampon MMA : 20mL de MES 100mM, 10mL de MgCl20,2M, 300 µl d'acetosyringone 100mM (150µM final) qsp H2OmQ à 200mL final. Ajuster le pH à 5,8.

MATÉRIEL VÉGÉTAL

Plantes transgéniques "16C" de 3 semaines qui surexpriment la GFP grâce à un promoteur constitutif (35S CaMV).



Ci-dessus : Carte du transgène inséré dans les plantes 16C (35S::GFP)



Plante surexprimant la GFP examinée sous les UV

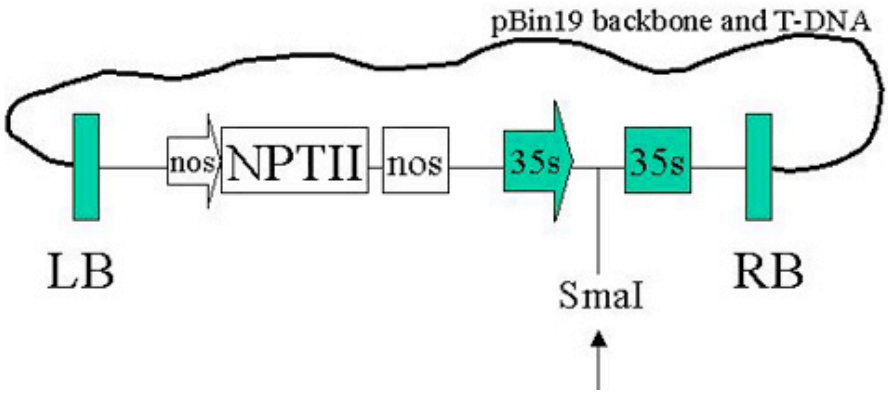
En rouge le point d'Agroinfiltration

CARTES DES PLASMIDES

pBIN19 plasmide de départ (résistance kanamycine et rifampicine)

pBIN19-35-Pro plasmide qui permet de surexprimer la protéine virale (PRO) dans les cellules végétales (résistance kanamycine et tétracycline)

35S-GFP plasmide qui permet de surexprimer la GFP dans les cellules végétales (résistance kanamycine et rifampicine)



Site de clonage de l'ADNc

Ci-dessus Carte du plasmide pBin19
NPTII gène de résistance à la kanamycine
LB (left border) RB (right border) : bordures gauches et droites qui permettent l'insertion du T-DNA au hasard dans le génome nucléaire.

ANNEXE 1

PROTOCOLES POUR LES WESTERNS BLOTS

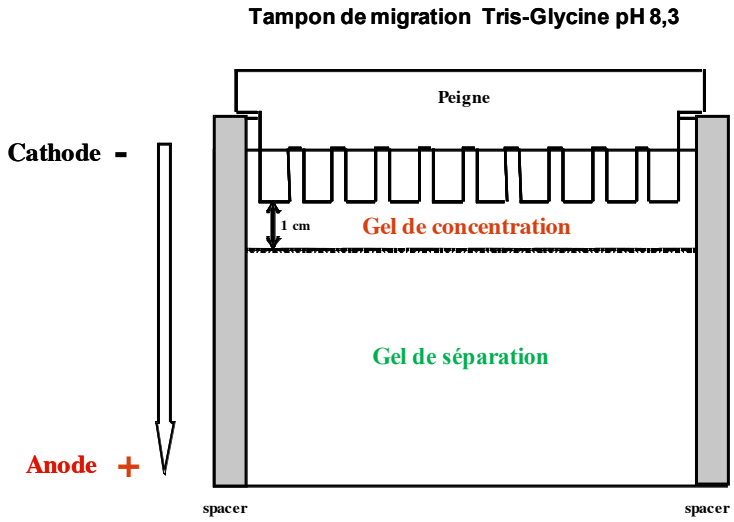
JOUR 3

Des westerns blots seront réalisés pour les manipulations sur cellules de drosophiles et cellules de mammifères.

SDS-PAGE :

1. Nettoyer soigneusement les plaques, les entretoises et les peignes à l'eau savonneuse, puis à l'alcool (Eliminer toutes les aspérités dues à l'acrylamide mais ne pas utiliser d'éponge corrosive). Monter le moule à gel selon les instructions. Marquer la limite du gel de séparation, en fonction de la profondeur des puits et de l'épaisseur du gel de concentration. Préparer la solution de **gel de séparation**, en mélangeant par aspiration/refoulement (tube Falcon de 50 mL).

Schématisation du montage du gel d'électrophorèse



Quantités pour 2 gels :

	8%	**10%**	**12%**	**15%**	**20%**
Acryl/Bis 29:1 40%	3,00 mL	3,75 mL	**4,50 mL**	5,60 mL	7,50 mL
Tris 1.5M, pH 8.8	3,75 mL	3,75 mL	**3,75 mL**	3,75 mL	3,75 mL
SDS 10%	0,25 mL	0,25 mL	**0,25 mL**	0,25 mL	0,25 mL
H_2O	8,00 mL	7,25 mL	**6,50 mL**	5,40 mL	3,50 mL
APS 10%	100 µL	100 µL	**100 µL**	100 µl	100 µL

NB : surtout ne pas autoclaver l'APS.

Ajouter 25 µL de TEMED à la solution d'acrylamide restant et couler les gels de séparation.

Recouvrir avec 500 µL d'éthanol et laisser polymériser.

Eliminer l'éthanol à l'eau distillée et égoutter soigneusement.

2. Préparer le **gel de concentration**, en mélangeant par aspiration/refoulement (tube Falcon de 15 mL)

Acryl/Bis 29:1 40%	500 µL
Tris 1 M, pH 6,8	625 µL
SDS 10%	50 µL
H_2O	3,80 mL
APS 10%	60 µL
Bleu bromoP 1%	2 µL ou quelques grains

- Ajouter le TEMED (20 µL) au dernier moment.

- Mélanger rapidement par aspiration/refoulement et couler le gel de concentration, puis poser immédiatement les peignes.

Une fois polymérisés les gels peuvent être stockés dans du papier humidifié de tampon et emballés dans du papier aluminium jusqu'au lendemain, à 4 °C.

JOUR4

3. Dépôt des échantillons et migration.

- Attendre la polymérisation complète sur gel

- Remplir l'appareil à électrophorèse de tampon de migration 1X, puis enlever délicatement les peignes.

- Rincer les puits avec le tampon pour éliminer les traces d'acrylamide (seringue)

- Déposer les échantillons (dont un marqueur de taille adapté) et compléter les puits vides avec 10 µL de SDS sample buffer 2X.

- Mettre sous tension (25 mA pour 1 minigel, 50 mA pour 2 minigels).

- Lorsque le bleu de migration atteint le bas du gel, arrêter et générateur et débrancher les fils électriques. Jeter le tampon et récupérer soigneusement le gel –> procéder à la coloration ou au transfert.

4. Solutions :

SDS Sample Buffer 2X

Glycérol	2 mL	22%
Bleu BromoP 20 mg		
Tris 1 M pH 6,8	1,25 mL	140 mM
SDS 20% (w/v)	2,5 mL	5,6%
EDTA 0,5 M	20 µL	1 mM
H_2O	QSP 9 mL	

Extemporanément, ajouter 100 µL de 2-mercaptoéthanol à 900 µL de tampon ou utiliser du DTT à la concentration finale de 0,04M. Conserver à -20°C.

Tampon de migration 5X (conserver à +4°C)

Tris Base	15.1 g
Glycine	72.0 g
SDS	5.0 g
H_2O	QSP 1 L

Marqueur de poids moléculaire de protéines : BIO-RAD Low Range (-20°C) : 19, 29, 37, 49, 81 et 103 kDa.

Dépôt de 10 µL par puit.

JOUR4 (suite)

Immunodétection sur membrane

1. Après séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, démonter l'appareil à électrophorèse. A l'aide d'un espaceur, éliminer le gel de concentration (gel supérieur). Placer le gel de l'eau distillée puis dans la solution de transfert pendant 5 min au moins.

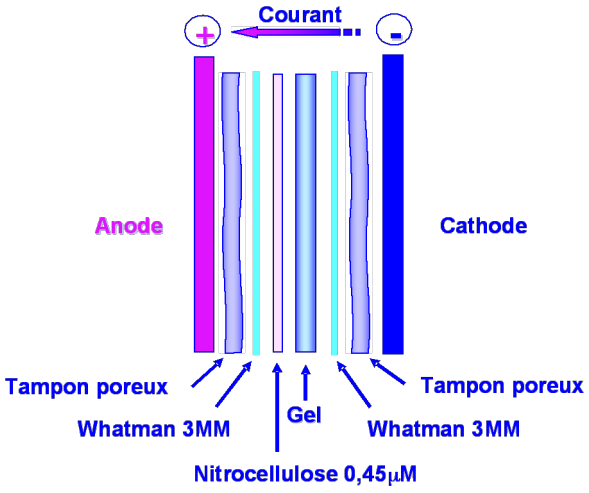
2. Dans un bac propre (débarrassé de toute trace de protéines), placer successivement la membrane

- dans de l'eau distillée (5 min)

- dans la solution de transfert (10 min)

3. Monter le sandwich entre les deux grilles (pôles + (rouge) et – (noir) indiqués). Tous les composants doivent être humidifiés. Les bulles doivent être éliminées à l'aide d'une pipette à chaque étape.

Montage du transfert électrophorétique



ANNEXE 2

Dosage des protéines par la méthode de Bradford

Principe

La technique de Bradford repose sur la fixation d'un colorant (Coomassie Brilliant Blue G-250) sur les protéines présentes en solution. Cette fixation entraîne un déplacement du pic maximal d'absorbance du colorant de 465nm vers 595nm. Le coefficient d'extinction du complexe protéine-colorant étant constant sur une large gamme de dilution, il est possible d'appliquer la loi de Beer-Lambert pour calculer la concentration en protéine. Celle-ci est déterminée par comparaison avec les valeurs d'absorbance obtenues pour une gamme de référence.

D'autres méthodes telles que la mesure de l'absorbance à 280nm (cycles aromatiques Trp, Tyr, et dans une moindre mesure Phe) ou à 205nm (liaison peptidique) sont utilisables. Pour chaque technique, les valeurs dépendront de la protéine de référence choisie (en général, l'albumine sérique bovine (BSA)).

Références

- *Current Protocols in Molecular Biology, Current Protocols. Ed Wiley.*

- *Biorad Protein Assay, Biorad. Manuel d'utilisation*

I. Méthode classique

a) Gamme étalon

- Préparer des tubes Eppendorf contenant 0 (2 tubes), 1.4, 7, 14, 28, 42 et 56 µg de BSA à partir d'une solution stock à 0,2 mg/mL.

- Ajouter 10 µL du tampon dans lequel se trouvent les protéines à doser.

- Compléter à 800 µL avec de l'eau distillée.

b) Préparation des échantillons

- Préparer des tubes Eppendorf contenant 2 ou 4 mL (surnageant de lyse) ou 10 µL (protéine purifiée) de solution protéique.

- Compléter à 800 µL avec de l'eau distillée.

c) Dosage

- Ajouter 200 µL de solution de Bradford concentrée dans chaque tube

- Vortexer

- Attendre 5 min, puis mesurer la densité optique à 595 nm dans des cuves en plastique.

- Tracer une courbe d'étalonnage OD595 = f (concentration BSA) sur papier millimétré.

- Déterminer la concentration dans l'échantillon.

ANNEXE 3

DETERMINATION DU TITRE D'UNE SUSPENSION A L'AIDE D'UNE CELLULE DE MALASSEZ

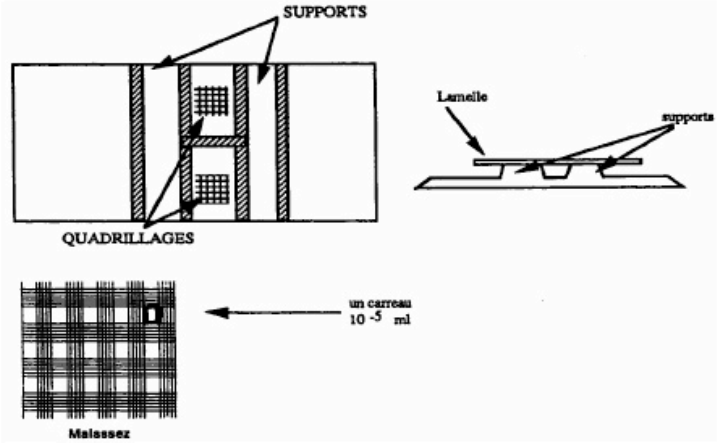
Pour compter le nombre de cellules dans une suspension cellulaire, on dispose d'une lame spéciale dite « cellule de Malassez ». Cette lame épaisse a la particularité de présenter en son centre un creux de profondeur très précise (0,2 mm). On dispose d'une lamelle très plane qui repose sur les bords de ce creux, ce qui délimite au centre une « chambre » de volume bien précis.

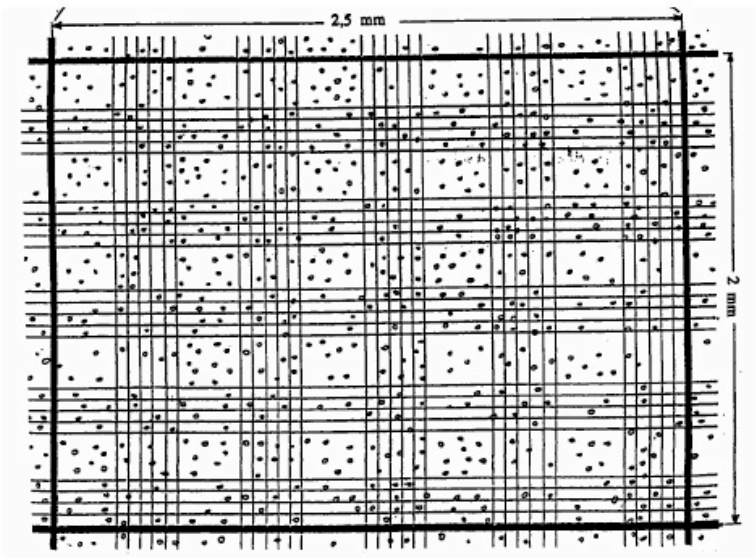
On introduit la suspension cellulaire dans cette chambre et le comptage se fait grâce à un quadrillage très fin gravé sur la lame, observé au microscope en même temps que les cellules.

Ce quadrillage est formé par un rectangle de 2,5 mm sur 2 mm subdivisé en 100 carreaux dont certains sont subdivisés en 20 petits carrés.

100 carreaux = 1 grille = 1 µl

Pour obtenir le titre d'une suspension : compter un nombre suffisant de carreaux pour dénombrer environ 100 cellules puis multiplier par 100 000 le nombre de cellules par carreaux. Exemple : on a compté 120 cellules pour 40 carreaux, donc le nombre de cellules par carreaux est de 120/40 =3 et le titre de la suspension est de 3 X 100 000 cellules/ml.





ANNEXE 4
LIENS INTERNET UTILES

Le site du Laboratoire de David Baulcombe à Cambridge, Royaume-Uni
http://www.plantsci.cam.ac.uk/research/baulcombe/

Description of plant viruses

http://www.dpvweb.net/

CONFERENCES EN LIGNE

Andrew Fire's Nobel Prize

http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/fire-lecture.html

Henry Stewart Talks
http://www.hstalks.com/main/search_bar.php?l=252&s=RNAi&k=TALK